

Федеральное агентство по образованию
ГОУ ВПО «Уральский государственный технический университет – УПИ»



М.И. Токарева, И.С. Селезнева

БИОХИМИЯ

В 3 частях

Часть 2

Учебное электронное текстовое издание
Подготовлено кафедрой «Технология органического синтеза»
Научный редактор: доц., канд. хим. наук Е.А. Садчикова

Методические указания к лабораторному практикуму для студентов дневной формы обучения специальности 070100 – Биотехнология.

Методические указания предназначены для самостоятельной подготовки и выполнения лабораторных работ по курсу «Биохимия». В практикум включены лабораторные работы по методам качественного обнаружения липидов, нуклеопротеидов и гормонов в различных биологических материалах, а также по методам исследования минерального состава мочи и определения мочевой кислоты, кетонных тел и белка в моче. Данная работа представляет собой 2-ю часть методических указаний к лабораторному практикуму.

© ГОУ ВПО УГТУ–УПИ, 2005

Екатеринбург
2005

СОДЕРЖАНИЕ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4. ЛИПИДЫ.....	2
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И АКТИВНОЙ РЕАКЦИИ МОЧИ	10
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6. НУКЛЕОПРОТЕИДЫ	21
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7. ГОРМОНЫ	266
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	31

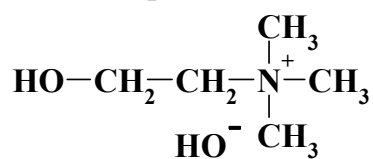
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 4

ЛИПИДЫ

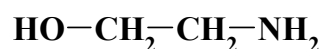
К липидам относятся нейтральные жиры и жироподобные вещества (липоиды). Все липиды нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в органических растворителях.

Нейтральные жиры представляют собой сложные эфиры глицерина и высших насыщенных (пальмитиновой $C_{15}H_{31}COOH$, стеариновой $C_{17}H_{35}COOH$) или ненасыщенных (олеиновой $C_{17}H_{33}COOH$, линолевой $C_{17}H_{31}COOH$, арахидоновой $C_{19}H_{31}COOH$) жирных кислот.

Среди липоидов наиболее распространенными являются фосфатиды и стериды. Фосфатиды (относятся к фосфолипидам) – это сложные эфиры, в состав которых входят глицерин, две молекулы жирной кислоты, фосфорная кислота и азотистые основания (фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и др.). Лецитины, содержащие холин, и кефалины, содержащие коламин, находятся в каждой клетке живого организма, но особенно много их в нервной ткани.

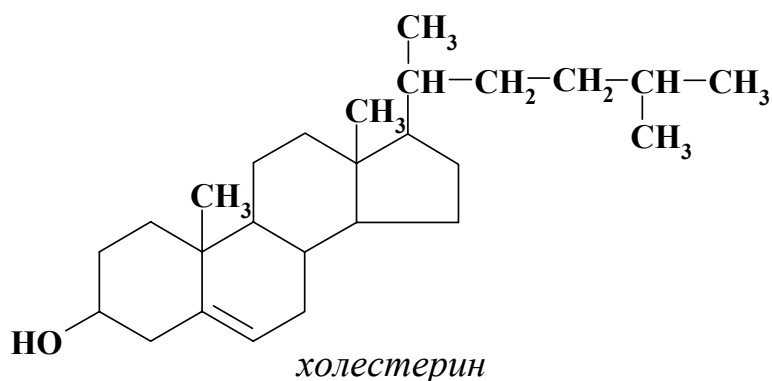


холин

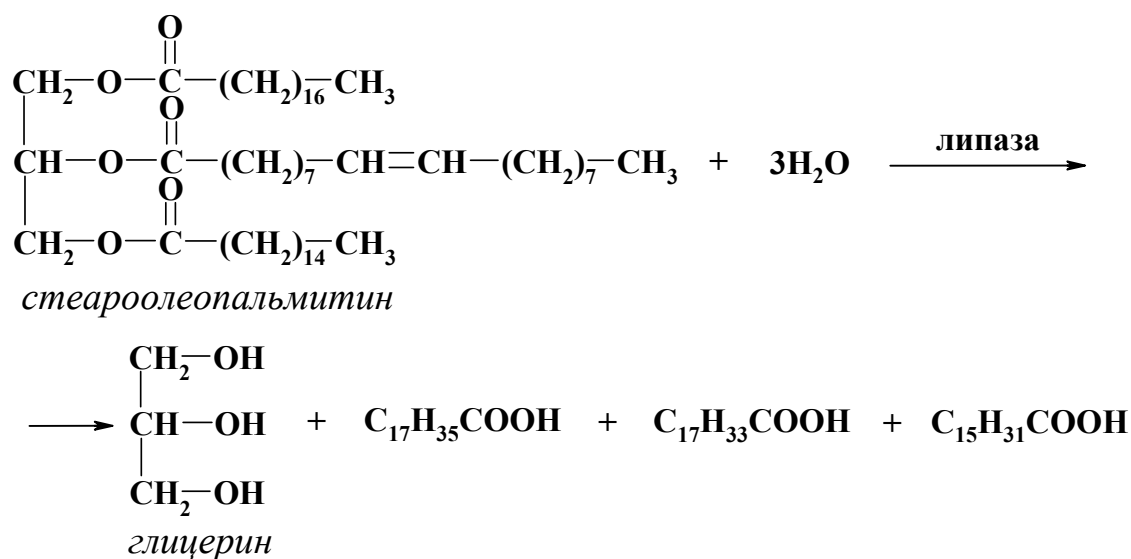


коламин

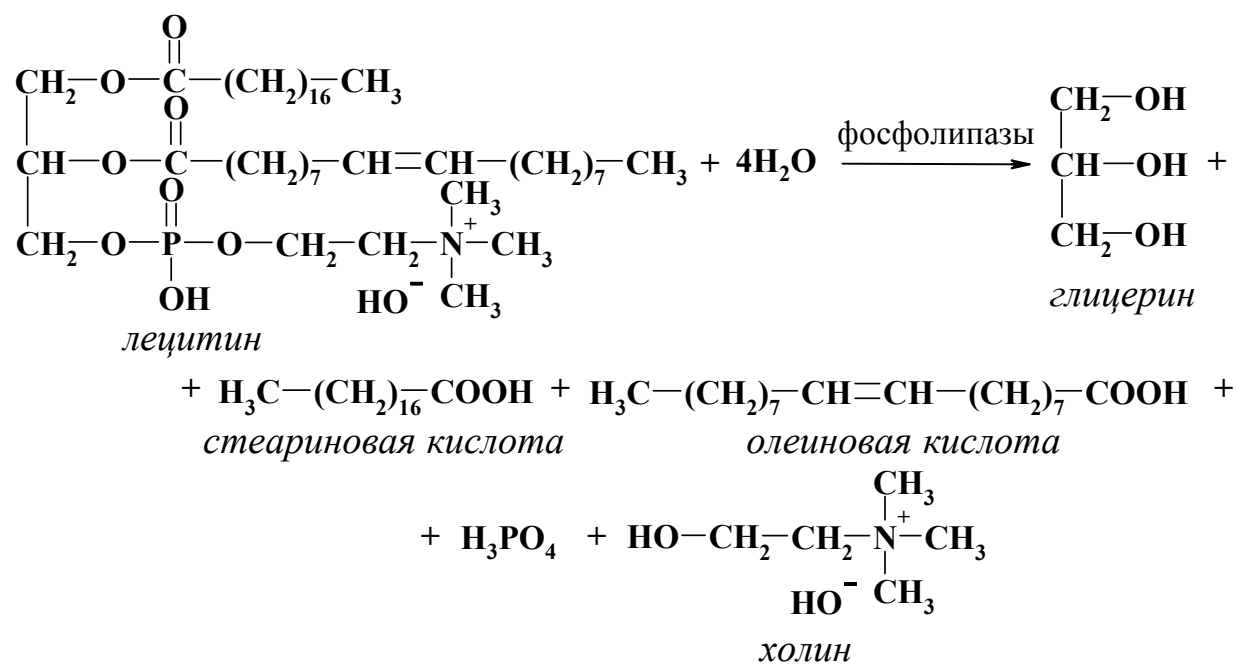
К группе стеридов относится холестерин. Он представляет собой высокомолекулярный одноатомный ненасыщенный спирт:



Переваривание липидов происходит преимущественно в тонком кишечнике и является гидролитическим процессом. Протекает он с участием ферментов: липаз, фосфолипаз, холестеролэстеразы и др. Под действием липазы нейтральный жир расщепляется на глицерин и жирные кислоты:

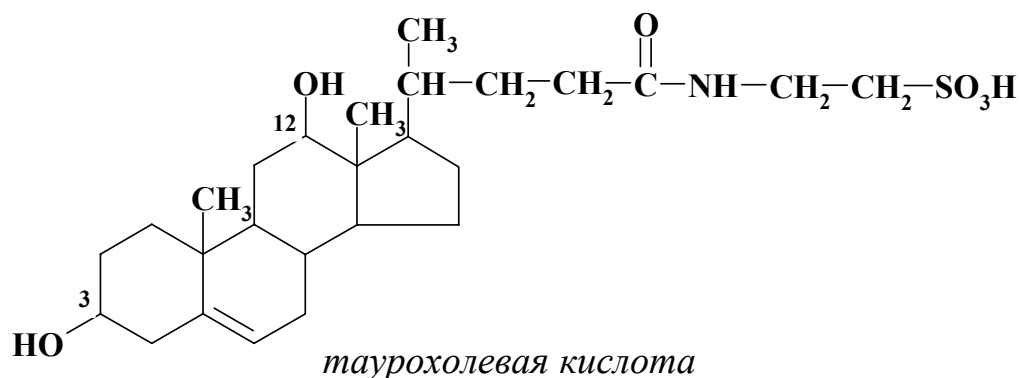
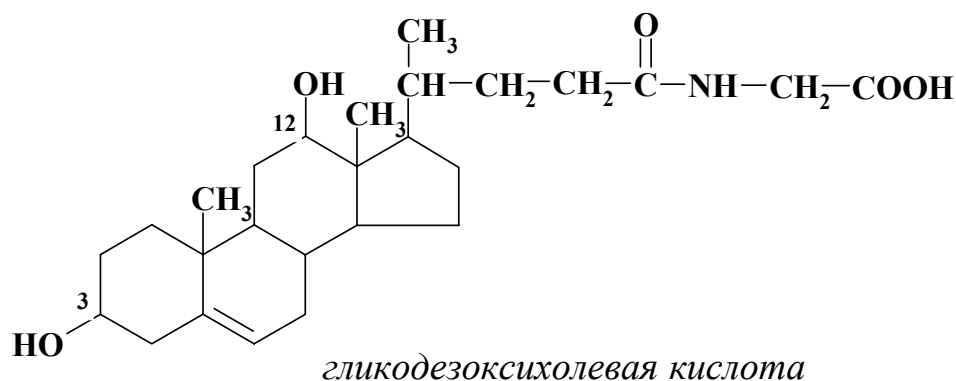


Лецитин под действием фосфолипаз А, В, С, Д расщепляется на глицерин, жирные кислоты, фосфорную кислоту и холин:



Продукты расщепления липидов всасываются в кишечнике. Хорошо растворимый в воде глицерин всасывается легко, а нерастворимые в воде жирные кислоты всасываются только в соединении с желчными кислотами в виде холеинового комплекса.

Желчные кислоты образуются в печени и выделяются с желчью в свободном виде или в виде парных соединений с гликоколом или таурином:



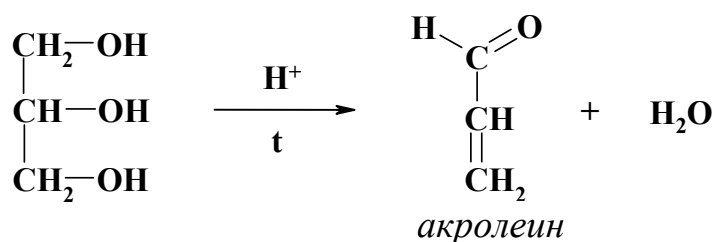
Желчные кислоты являются поверхностно-активными веществами и принимают участие в эмульгировании жиров, снижая поверхностное натяжение жировых капель, а также в активировании липазы и всасывании жирных кислот.

В клетках стенки кишечника холеиновый комплекс распадается, освободившиеся желчные кислоты через систему воротной вены поступают снова в печень, а жирные кислоты в стенке кишечника соединяются с глицерином и образуют жир, специфичный для данного организма. Из клеток кишечника этот жир переходит в лимфатическую систему и частично в кровь, а затем в печень и другие органы, где подвергается разнообразным превращениям.

Для изучения состояния липидного обмена в организме используется определение содержания липидных комплексов в биологических жидкостях.

4.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ЛИПИДОВ

В основе реакции лежит способность глицерина к дегидратации при нагревании с образованием акролеина, обладающего специфическим, резким запахом:



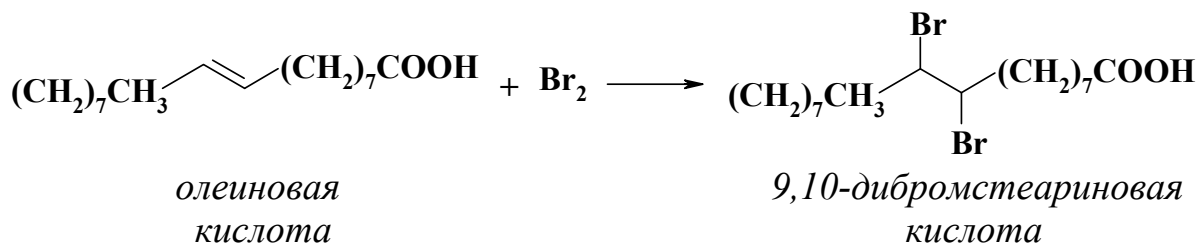
С помощью этой реакции обнаруживают глицерин, входящий в состав нейтральных жиров и фосфолипидов.

Ход определения

В сухую пробирку вносят 1–2 капли растительного масла и на кончике шпателя порошок гидросульфата калия. Нагревают до появления белых паров акролеина с резким запахом. Прodelывают эту же работу с кусочком воска. Наблюдается ли выделение акролеина?

4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В пробирку вносят 8–10 капель бромной воды и 2–3 капли подсолнечного масла (содержит большое количество непредельных жирных кислот). Содержимое пробирки взбалтывают. Происходит обесцвечивание бромной воды:



Степень непредельности жиров, обусловленную присутствием непредельных жирных кислот, количественно определяют по присоединению галогенов по месту двойной связи (йода, брома).

4.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЖЕЛТКЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

Лецитины, относящиеся к группе фосфолипидов, не растворяются в воде и ацетоне, но хорошо растворяются в этиловом спирте, эфире и хлороформе. Поэтому они могут быть выделены из раствора добавлением ацетона или воды.

Для приготовления раствора лецитина в стакан помещают 0,5 желтка куриного яйца и, помешивая, прибавляют 40 мл горячего этилового спирта. Раствор охлаждают и фильтруют в сухую колбу.

Ход определения

В сухую пробирку вносят 10 капель ацетона и 1–2 капли концентрированного желтка. Выпадает белый осадок.

В другую пробирку прибавляют к 20 каплям спиртового раствора желтка несколько капель дистиллированной воды до образования устойчивой эмульсии.

В третью сухую пробирку вносят 10 капель спиртового раствора желтка и добавляют 2–4 капли насыщенного спиртового раствора CdCl_2 . Наблюдают выпадение осадка белого цвета.

Сделайте заключение о наличии лецитина в желтке куриного яйца.

4.4. ГИДРОЛИЗ ЛЕЦИТИНОВ И ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА

В результате гидролиза лецитин распадается на составные части: жирные кислоты, холин, глицерин и фосфорную кислоту. В растворе устанавливают их наличие.

Ход определения

Обнаружение холина. К 1–2 мл спиртового экстракта желтка добавляют равный объем 10 %-го раствора NaOH и кипятят 5–10 мин. При нагревании ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, образующегося из холина.

Обнаружение жирных кислот. Полученный гидролизат разбавляют небольшим количеством воды и подкисляют 10 %-м раствором HCl . Выпадает осадок свободных жирных кислот, который отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют 10 %-м раствором щелочи и упаривают на водяной бане досуха.

Обнаружение глицерина. Часть сухого остатка смешивают с несколькими кристаллами KHSO_4 и нагревают. При этом ощущается резкий запах акролеина, образовавшегося из глицерина.

Обнаружение фосфорной кислоты. Другую часть сухого остатка сплавляют в тигле с небольшим количеством KNO_3 и Na_2CO_3 . К охлажденному сплаву приливают 2 мл конц. HNO_3 и растирают палочкой, раствор сливают в пробирку и нагревают с небольшим избытком молибденовокислого аммония (5–6 мл). При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

4.5. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА

По химической природе холестерин является циклическим ненасыщенным вторичным спиртом. В основе реакции обнаружения холестерина лежит его способность образовывать окрашенные соединения в присутствии серной кислоты и уксусного ангидрида. Этой реакцией пользуются для количественного определения холестерина в крови. У здоровых взрослых людей в сыворотке крови содержится 1,5–2,5 г/л холестерина.

Содержание его увеличивается у людей пожилого возраста, а также при атеросклерозе, заболеваниях печени, нефрозе, при хроническом панкреатите, гипотиреозе, при сахарном диабете. Уменьшение содержания холестерина в сыворотке крови наблюдается при тяжелых поражениях печени (цирроз в терминальной стадии, некроз), при сердечной недостаточности с застойной печенью, тяжелой уремии, сепсисе, гипертиреозе.

4.5.1. Реакция Сальковского

Под действием концентрированной серной кислоты происходит дегидратация холестерина с образованием холестерилена – соединения красного цвета. В сухую пробирку вносят 1 мл хлороформного раствора холестерина или растительного масла и осторожно по стенке пробирки добавляют 0,5 мл конц. H_2SO_4 .

На границе жидкостей появляется красное кольцо.

4.5.2. Реакция Либермана – Бурхардта

Эта реакция лежит в основе фотоэлектрокалориметрического метода количественного определения общего холестерина сыворотки крови (по Блюру).

Ход определения:

В сухую пробирку вносят 1 мл 1 %-го раствора холестерина или растительного масла в хлороформе, 5 капель уксусного ангидрида и наслаивают по стенке 2–3 капли конц. H_2SO_4 . Пробирку помещают на 20 мин в темное место. Постепенно появляется сине-зеленое окрашивание.

4.6. РАСТВОРЕНИЕ И ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ ЖИРОВ

Жиры растворяются в органических растворителях и не растворяются в воде. Эмульгирование жиров (равномерное распределение в растворе) ис-

пользуется в технике и быту для удаления жира. В организме человека только эмульгированные жиры подвергаются действию ферментов и распадаются на более простые продукты.

Ход определения

В пять пробирок вносят по 3 капли растительного масла и затем добавляют по 10 капель: ацетона в первую пробирку, бензола во вторую пробирку, хлороформа в третью, диэтилового эфира в четвертую и этанола в пятую. Пробирки встряхивают и наблюдают за растворением жира в различных растворителях.

В шесть пробирок вносят по 2 капли растительного масла и по 3 капли дистиллированной воды. Затем добавляют по 4 капли: 1 %-го раствора яичного белка в первую пробирку, 10 %-го раствора КОН во вторую пробирку, 10 %-го раствора NaHCO_3 в третью, 1 %-го мыльного раствора в четвертую и желчи в пятую пробирку. Шестая пробирка служит для контроля. Пробирки встряхивают и наблюдают образование устойчивой эмульсии или расслоение.

В отчете результаты опыта оформляют в виде таблицы.

Таблица 3.1

Эмульгирование жиров						
Степень эмульгирования	Вода	Желчь	Белок	Мыло	Сода	Щелочь
Растворение жиров						
Степень растворения	Бензин	Бензол	Хлороформ	Диэтиловый эфир	Этанол	

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 5

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И АКТИВНОЙ РЕАКЦИИ МОЧИ

Все процессы, идущие в организме, протекают в водной среде, поэтому трудно переоценить роль воды в его жизнедеятельности. Минеральные вещества участвуют в построении всех органов и тканей, обеспечивают поддержание осмотического давления, активируют многие ферменты и т. д. Содержание воды и минеральных солей в крови и моче в норме постоянно, поэтому их определение имеет важное значение для характеристики состояния организма.

Химический состав мочи

Неорганические компоненты: ионы натрия, калия, кальция, магния, аммония, хлора, фосфаты.

Органические компоненты: мочевины, мочевая кислота, креатинин, гиппуровая кислота, индикан.

Патологические компоненты: белок, глюкоза, кровь, кетоновые тела, билирубин.

5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИИ МОЧИ

Реакция мочи в норме колеблется в диапазоне рН 5–7, она зависит от характера питания. Моча человека и плотоядных животных имеет слабокислую или кислую реакцию. Явно выраженный кислый характер мочи приобретает при диабете, когда в ней в больших количествах появляются кетоновые тела. Щелочную реакцию мочи может иметь при рвоте, некоторых заболеваниях мочеполовых путей, при приеме соды, минеральных вод. Реакцию мочи определяют по изменению окраски лакмусовой или универсальной индикаторной бумаги или, применяя в качестве индикатора бромтимоловый синий.

Ход определения

На предметное стекло, помещенное на лист белой бумаги, кладут универсальную индикаторную бумагу. На нее стеклянной палочкой наносят каплю мочи и наблюдают за изменением окраски индикатора.

Для определения реакции мочи по бромтимоловому синему к 1–2 мл мочи прибавляют 1 каплю раствора индикатора и наблюдают изменение ок-

раски. При кислой реакции цвет мочи будет желтым, при слабокислой – бурым, при слабощелочной – зеленым, а при щелочной реакции – синим.

Опыты сравнивают и делают вывод о рН мочи.

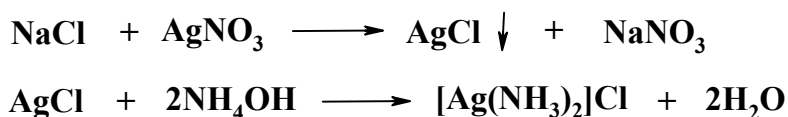
Раствор бромтимолового синего готовят из 1 %-го спиртового раствора индикатора, разбавляя его дистиллированной водой в соотношении 1:3. Получают 0,25 %-й раствор индикатора.

5.2. ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА МОЧИ

5.2.1. Открытие хлоридов в моче

За сутки с мочой выделяется около 15 г хлоридов (в расчете на NaCl). При некоторых заболеваниях (крупозная анемия, рак, поражения почек) наблюдается задержка хлоридов в организме. Определение содержания хлоридов в моче важно при назначении бессолевой диеты. Количество хлоридов в моче здорового человека приблизительно соответствует содержанию хлорида натрия (NaCl) в пище.

Определение хлоридов основано на образовании хлорида серебра (AgCl), нерастворимого в азотной кислоте (HNO₃), но растворимого в водном растворе аммиака (NH₄OH):



Ход определения

К 20 каплям мочи добавляют 2–4 капли 1 %-го раствора нитрата серебра (AgNO₃). Выпадает белый творожистый осадок AgCl, темнеющий на свету, нерастворимый в азотной кислоте, но растворимый в аммиаке. Содержимое пробирки перемешивают, часть переливают в другую пробирку и добавляют 1–2 капли 10 %-го раствора аммиака. Осадок растворяется. К другой части добавляют по каплям 10 %-й раствор азотной кислоты, растворения осадка не происходит.

5.2.2. Открытие фосфатов в моче

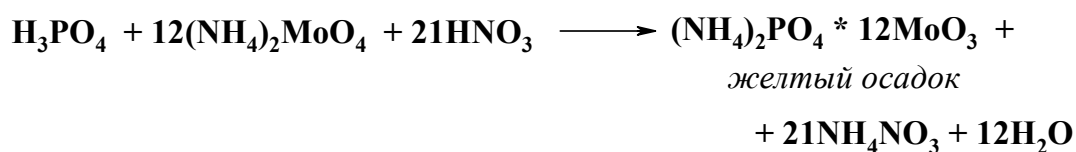
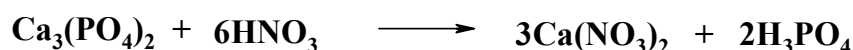
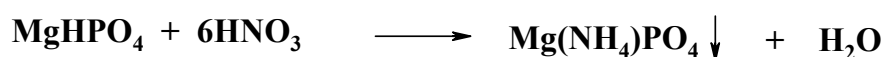
Фосфор имеет большое значение для организма. Он входит в состав костной и зубной ткани, поддерживает осмотическое давление, а фосфорсодержащие соединения (аденозинтрифосфаты) – основной источник энергии в организме. Фосфор обеспечивает активирование глюкозы, жирных кислот,

аминокислот, избирательную проницаемость клеточных мембран. Фосфорнокислые соли образуются в организме в результате распада фосфорсодержащих органических веществ: нуклеопротеидов, фосфопротеидов, фосфатидов, АТФ и т. д. Фосфор выделяется с мочой в виде одно- и двузамещенных солей калия, натрия, кальция, магния, аммония.

Количество выделяемых с мочой солей фосфорной кислоты отражает интенсивность обмена фосфорсодержащих органических соединений и в норме у взрослого человека составляет 1,5–6,0 г в сутки в расчете на оксид фосфора (V). Повышенное содержание фосфора в моче бывает при лейкемии, инфекционных заболеваниях, пониженное – при рахите. В основе определения фосфатов лежит их способность образовывать желтый осадок с молибденовым реактивом.

Ход определения

К 20 каплям мочи добавляют 2–3 капли 10 %-го раствора аммиака. Образовавшийся осадок фосфорнокислых солей кальция и магния отфильтровывают и растворяют на фильтре в 2–3 каплях 10 %-го раствора азотной кислоты. К полученному раствору добавляют 10–15 капель молибденового реактива и кипятят. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет, а при охлаждении выпадает кристаллический желтый осадок фосфорномолибденовоокислого аммония:

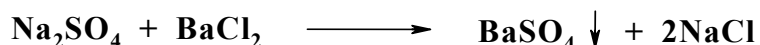


Для приготовления молибденового реактива 7,5 г молибденовоокислого аммония растворяют в 100 мл 32 %-го раствора азотной кислоты.

5.2.3. Обнаружение сульфатов

В организме сера принимает участие во многих процессах обмена, в том числе, в синтезе гормонов (инсулина, окситоцина), в обезвреживании токсических продуктов (фенола, крезола). Серусодержащие вещества мочи

образуются в результате превращений белков в тканях. Сера выделяется с мочой в виде неорганических сульфатов, солей эфиросерных кислот и в виде так называемой нейтральной серы (например, цистеина, роданистых солей и др.). Количество выделенных сульфатов зависит от содержания в пище белков. В среднем за сутки выделяется около 2,5 г серы в виде сульфатов. Сульфаты в моче обнаруживают по появлению белого осадка сульфата бария, нерастворимого в кислотах и щелочах.



Ход определения

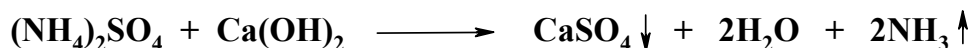
К 20 каплям мочи добавляют 5 капель 10 %-го раствора соляной кислоты и по каплям 5 %-й раствор хлорида бария до полного осаждения белого кристаллического осадка сульфата бария.

5.2.4. Обнаружение аммонийных солей

На долю аммонийных солей приходится 4–5 % общего количества азота мочи, что соответствует выделению 0,6–1,2 г аммиака в сутки.

Ход определения

В пробирку наливают 2–3 мл мочи и 1–2 мл известкового молока (насыщенного раствора гидроксида кальция), смешивают обе жидкости и подносят к отверстию пробирки фенолфталеиновую или универсальную индикаторную бумажку, предварительно смоченную водой, не касаясь стенок пробирки. Через некоторое время фенолфталеиновая бумажка краснеет, а универсальная индикаторная синееет вследствие выделения аммиака по реакции:



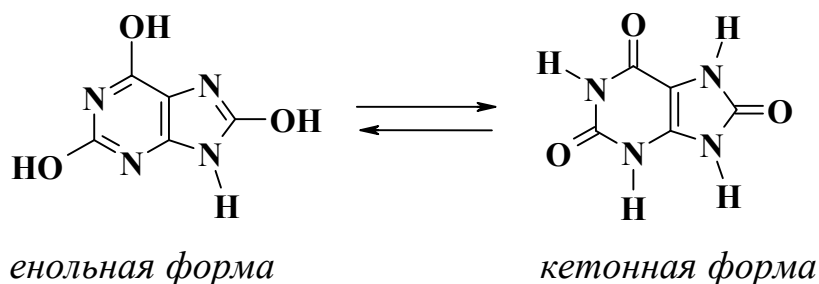
Для обнаружения аммиака можно использовать и красную лакмусовую бумажку, также предварительно смоченную водой. Она приобретает синий цвет.

5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

У человека мочевая кислота является конечным продуктом пуринового обмена и относится к числу важных азотистых составных частей мочи. В норме человек в среднем выделяет 0,6–0,7 г мочевой кислоты в сутки. Количество ее в моче возрастает при включении в пищевой рацион продуктов, богатых пуринами, а также при лейкемии и лихорадочных состояниях. Мочевая

кислота является главной составной частью отложений, возникающих при подагре в хрящах, суставах, сухожилиях.

Мочевая кислота существует в виде двух таутомерных форм:

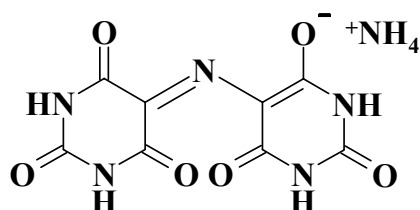


5.3.1. Выделение мочевой кислоты

Для получения кристаллов мочевой кислоты на предметное стекло наносят каплю мочи и осторожно упаривают ее при температуре не выше 60–70 °С, проводя предметное стекло над пламенем горелки и контролируя степень нагрева тыльной поверхностью руки. В то же самое место наносят вторую каплю мочи и также упаривают ее. Добавляют 1 каплю 1–2 %-го раствора соляной кислоты, накрывают покровным стеклом и наблюдают образование мочевой кислоты под микроскопом. Кристаллы мочевой кислоты разнообразны, но преобладают ромбовидные формы. Они имеют слабый желтоватый оттенок, т. к. окрашены пигментами мочи.

5.3.2. Мурексидная проба на мочевую кислоту

Порошок мочевой кислоты (с булавочную головку) помещают на предметное стекло, прибавляют 1–2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно, не нагревая выше 70 °С, выпаривают досуха, сдувая образующиеся пары низших оксидов азота. Охлаждают и к коричневому остатку добавляют с одного края каплю 25 %-го раствора аммиака. При этом появляется пурпурно-красное окрашивание вследствие образования мурексида (аммонийной соли пурпурной кислоты):



С другого края на коричнево-красный остаток наносят 1 каплю 10 %-го раствора гидроксида натрия или калия, появляется фиолетовое окрашивание. Этой пробой пользуются для определения мочевой кислоты в мочевых камнях.

5.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В МОЧЕ

Моча здорового человека практически не содержит белка. В ряде патологических случаев в моче может появиться белок в количестве 25 г в сутки (протеинурия, альбуминурия).

Цветные реакции мало пригодны для обнаружения белка в моче, т. к. и нормальная, и патологическая моча содержат вещества, препятствующие образованию окрашенных продуктов реакций.

Для обнаружения белка в моче обычно применяют три реакции его осаждения: кипячением, концентрированной азотной кислотой (проба Хеллера) и сульфосалициловой кислотой.

5.4.1. Осаждение кипячением

Предварительно проверяют реакцию мочи универсальным индикатором. Если моча имеет кислую реакцию, то ее (2–3 мл) сразу кипятят в пробирке, а если щелочную, то ее сначала слегка подкисляют добавлением по каплям 1 %-го раствора уксусной кислоты до слабокислой реакции по универсальному индикатору. В присутствии белка при кипячении образуется муть или осадок, не растворяющийся при повторном кипячении после добавления к жидкости 3–5 капель 10 %-го раствора уксусной кислоты. Этим осадок белков отличается от осадка фосфатов и карбонатов кальция и магния, которые могут выпасть при кипячении в слабокислой среде, но растворяются при нагревании в более кислом растворе уксусной кислоты.

5.4.2. Проба Хеллера

В пробирку наливают 1 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно из пипетки по стенке пробирки наслаивают мочу. В присутствии белка на границе обеих жидкостей через 2–4 минуты образуется аморфный слой или муть, т. н. белковое кольцо. При отсутствии белка в моче на грани-

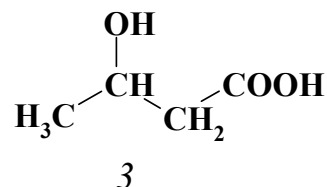
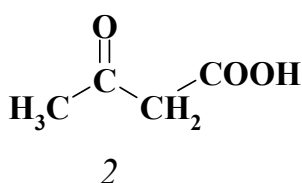
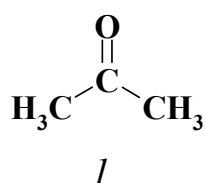
це жидкостей появляется прозрачное цветное кольцо, обусловленное изменением пигментов мочи под влиянием азотной кислоты.

5.4.3. Проба с сульфосалициловой кислотой

К 1–2 мл мочи добавляют 2–3 капли свежеприготовленного 20 %-го раствора сульфосалициловой кислоты. При наличии белка в моче образуется белый осадок или муть.

5.5. РЕАКЦИИ НА КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

Ацетоновыми, или кетоновыми, телами называют ацетон (1), ацетоуксусную кислоту (2), и 3-гидроксимасляную кислоту (3):



Эти вещества являются продуктами неполного распада жиров. При нормальном обмене жира и углеводов они почти полностью окисляются и в крови содержатся в небольшом количестве (около 0,01 г/л). Однако, при некоторых заболеваниях, например при сахарном диабете, а также при голодании и неправильном режиме их количество значительно возрастает: в крови до 1–3 г/л, а в моче за сутки выделяется до 40 г при норме 0,04–0,05 г. В этом случае кетоновые тела выделяются также кожей и легкими, из-за чего у больного человека иногда ощущается запах ацетона.

5.5.1. Реакция на образование йодоформа (проба Либена)

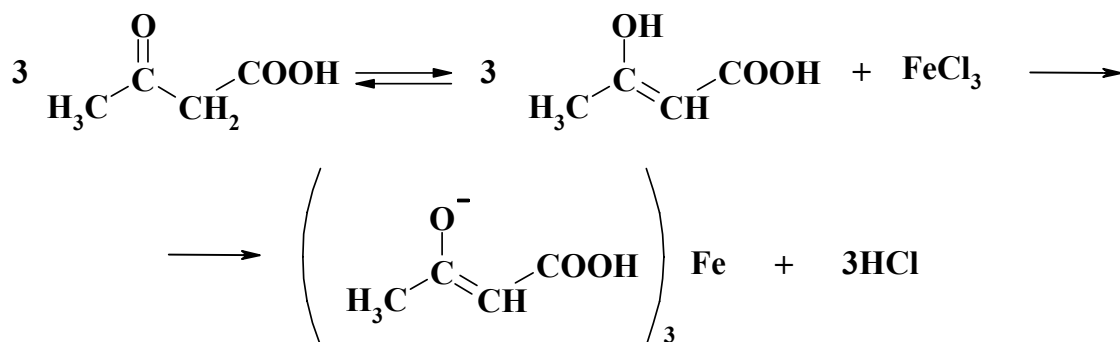
В пробирку вносят 10 капель ацетона, 10 капель 10 %-го раствора NaOH и несколько капель раствора Люголя – 1 %-го раствора йода в 2 %-м растворе KI. Наблюдают выпадение желтого осадка йодоформа, обладающего характерным запахом.



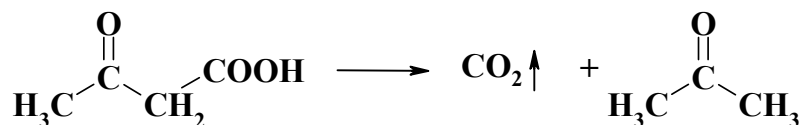
Аналогичную реакцию проделывают с 2–3 мл мочи. При наличии ацетона в моче жидкость мутнеет.

5.5.2. Реакция на ацетоуксусную кислоту (реакция Герхарда)

Наливают в пробирку 10 капель 0,5 %-го раствора ацетоуксусной кислоты и 2 капли 10 %-го FeCl_3 . Возникает вишнево-красное окрашивание. При выполнении аналогичной реакции с мочой необходимо учесть, что после добавления первых двух капель раствора FeCl_3 выпадает осадок фосфата железа (III) – FePO_4 . Поэтому для получения вишнево-красного окрашивания необходимо добавить еще несколько капель этого реактива.



Окраска постепенно бледнеет при стоянии вследствие самопроизвольного декарбоксилирования ацетоуксусной кислоты:



При кипячении мочи этот процесс протекает очень быстро.

5.5.3. Проба Легалья на ацетон и ацетоуксусную кислоту

Метод основан на способности ацетона и ацетоуксусной кислоты в щелочной среде образовывать с нитропруссидом натрия комплексы оранжево-красного цвета, а при подкислении раствора – соединения вишнево-красного цвета.

Ход определения

В одну пробирку вносят 10 капель исследуемой биологической жидкости, а в другую столько же капель ацетона, добавляют две капли свежеприготовленного 10 %-го раствора нитропрусида натрия и 4 капли 10 %-го раствора NaOH . Появляется оранжево-красное окрашивание. Вносят в пробирку 10 капель концентрированной уксусной кислоты и наблюдают за изменением окраски. Наблюдения сравнивают.

5.6. ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В МОЧЕ

В ступке растирают в тонкий порошок 1 г CuSO_4 и 10 г Na_2CO_3 . На предметное стекло насыпают немного порошка и наносят несколько капель мочи, подогревают до кипения. Синий цвет означает, что глюкозы нет, желтовато-зеленый означает, что глюкозы не более 0,5 %, зеленый – не более 1 %, коричнево-красный – до 2 %, интенсивно красный – свыше 2 %.

5.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА В МОЧЕ (ПРОБА РОЗИНА)

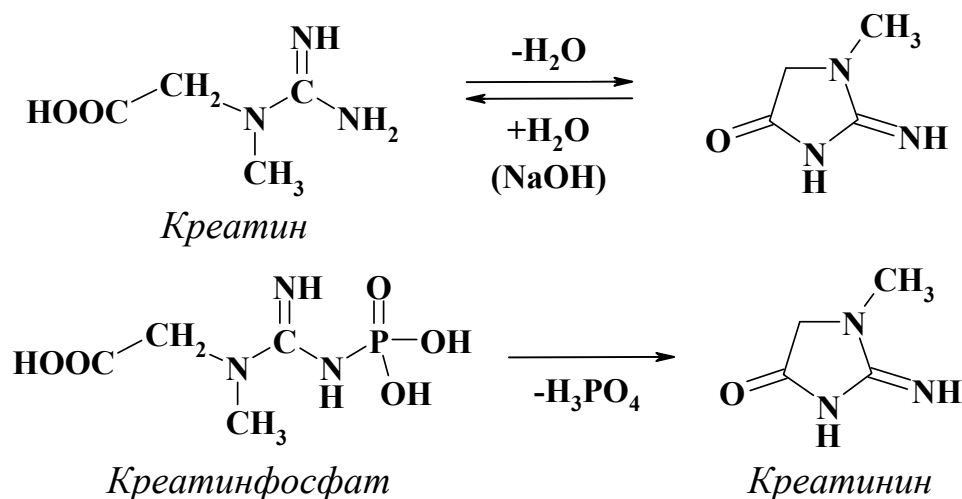
Данная реакция основана на превращении билирубина под воздействием окислителей (I_2) в биливердин зеленого цвета.

Ход определения

На 3–4 мл мочи осторожно наслаивают 1–2 мл 1%-ного спиртового раствора I_2 или раствора Люголя. При наличии желчных пигментов (билирубина) на границе жидкостей появляется зеленое кольцо.

5.8. ОБНАРУЖЕНИЕ КРЕАТИНИНА В МОЧЕ (РЕАКЦИЯ ВАЙЛЯ)

Креатинин является одним из конечных продуктов азотистого обмена и образуется из креатинфосфата:



За сутки с мочой обычно выделяется 1,3–2 г креатинина, что составляет 2,5–7 % всего объема мочи. Количество выделяемого креатинина прямо зависит от содержания креатинфосфата в мышцах, а также от содержания креатина в пище (его много в мясе). Повышенное выделение креатинина наблюдается при лихорадочных состояниях, инфекциях, болезнях почек, сахарном и несахарном диабете и различных патологиях мышц.

Ход определения

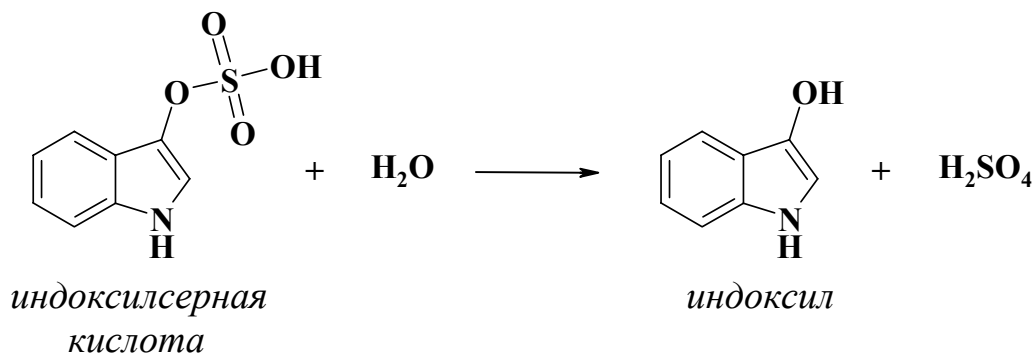
К 2 мл мочи добавляют 5–6 капель 10 %-го раствора NaOH и 3–4 капли свежеприготовленного раствора нитропруссид натрия. Жидкость окрашивается в красный цвет. При подкислении раствора уксусной кислотой красная окраска сразу же переходит в желтую. Это отличает реакцию на креатинин от аналогичной реакции на ацетон, при которой красная окраска не исчезает при подкислении.

5.9. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ИНДИКАН

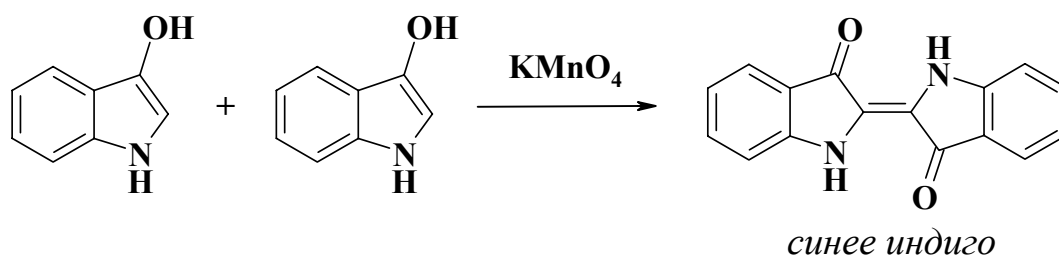
В кишечнике под влиянием различных бактерий происходит разложение аминокислот с образованием ядовитых для организма продуктов (индол, скатол и др.), которые всасываются в кровь и обезвреживаются в печени путем образования нетоксических веществ (серных и глюкуроновых кислот).

Индикан – это калиевые или натриевые соли индоксилсерной кислоты. В норме за сутки с мочой выделяется 0,01 г индикана. При непроходимости кишечника, перитоните, туберкулезе количество индикана повышается.

При действии на мочу концентрированной H_2SO_4 происходит гидролиз индоксилсерной кислоты:



При добавлении хлороформа и нескольких капель раствора $KMnO_4$ индоксил окисляется в синее индиго:



Полученное синее индиго переходит в хлороформный слой и окрашивает его в синий цвет. Интенсивность полученной окраски является показателем количества индикана в исследуемой моче.

Ход определения

В пробирку наливают 2–3 мл мочи и добавляют при перемешивании равный объем конц. H_2SO_4 . Затем добавляют примерно 2–3 капли 2 %-го раствора $KMnO_4$ и 2 мл хлороформа. Закрывают пробирку пробкой и несколько раз перевертывают, не встряхивая. Пробирку ставят в штатив и наблюдают за появлением синего окрашивания нижнего хлороформного слоя.

Таблица 5.1

Характеристика исследуемой мочи

pH = _____, среда _____

Компонент мочи	Наличие	Компонент мочи	Наличие
Хлориды		Кетоновые тела	
Фосфаты		Глюкоза	
Сульфаты		Билирубин	
Аммонийные соли		Креатинин	
Мочевая кислота		Индикан	
Белок			

Заключение: _____

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 6

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

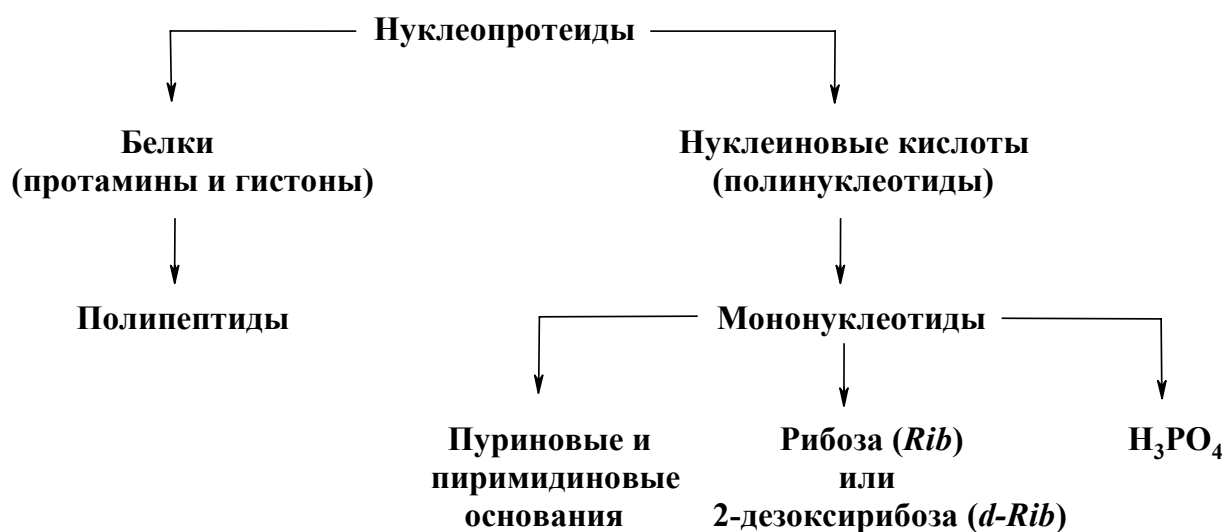
Нуклеопротеиды представляют собой сложные белки, содержащие в качестве простетической группы нуклеиновые кислоты. Из этих белков состоит основная масса клеточного ядра. Поэтому нуклеопротеиды могут быть выделены из тканей, богатых ядерным веществом (зобной железы, семенников, сперматозоидов и др.).

Нуклеопротеиды играют важную биологическую роль, являясь структурными элементами клетки (ее ядра и цитоплазмы) и выполняя важнейшие специфические функции в живом организме. Деление клеток, биосинтез белков, передача наследственной информации тесно связаны с нуклеопротеидами, в частности с входящими в их состав нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК).

Нуклеиновые кислоты являются высокомолекулярными соединениями, построенными из большого числа нуклеотидов, которые состоят из гетероциклического основания (пуринового или пиримидинового) и углеводной компоненты (рибозы или 2-дезоксирибозы), а также фосфорной кислоты.

Изучение состава нуклеопротеидов

При проведении частичного гидролиза нуклеопротеиды распадаются на составные части: белки, преимущественно основного характера (протамины и гистоны), и нуклеиновые кислоты. Более полный гидролиз приводит к распаду белков и нуклеиновых кислот:



Исследование химического состава нуклеопротеидов проводят на примере дрожжей, которые подвергают гидролизу с последующим изучением

его продуктов (полипептидов, пуриновых оснований, углеводных компонентов и фосфорной кислоты).

6.1. ПРОВЕДЕНИЕ ГИДРОЛИЗА

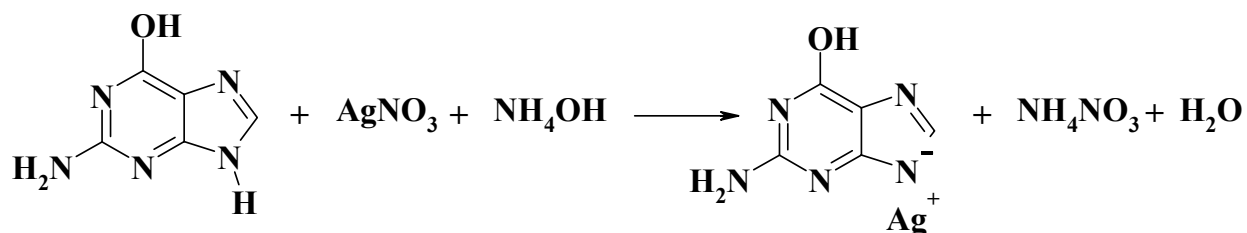
В круглодонную колбу на 100 мл помещают 1 г свежих или 0,2 г сухих пекарских дрожжей, приливают 20 мл 10 %-го раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с воздушным холодильником, закрепляют с небольшим наклоном и кипятят под тягой 1 час. Охлаждают, доводят объем до первоначального дистиллированной водой, отфильтровывают через складчатый фильтр. С фильтратом проводят следующие реакции.

6.2. БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ НА ПОЛИПЕПТИДЫ

К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель 10 %-го раствора NaOH и 1–2 капли 1 %-го раствора CuSO₄ до появления сине-фиолетового или красно-фиолетового окрашивания.

6.3. СЕРЕБРЯНАЯ ПРОБА НА ПУРИНОВЫЕ ОСНОВАНИЯ

Метод основан на способности пуриновых оснований с аммиачным раствором AgNO₃ образовывать осадок серебряных солей пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенных в светло-коричневый цвет:



В пробирку вносят 10 капель гидролизата дрожжей, добавляют по каплям концентрированный раствор NH₄OH до щелочной реакции по универсальной индикаторной бумаге (1–10 капель) и 10 капель аммиачного раствора AgNO₃, который готовят добавлением концентрированного раствора NH₄OH к 2–3 %-му раствору AgNO₃ до растворения осадка. Через 3–5 минут образуется рыхлый бурый осадок серебряных соединений пуриновых оснований.

6.4. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ПЕНТОЗЫ

6.4.1. Дифениламиновая проба (реакция Дише)

Метод основан на способности дезоксирибозы ДНК образовывать соединения синего цвета с дифениламином при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и концентрированной серной кислот. С рибозой РНК аналогичная реакция дает зеленое окрашивание.

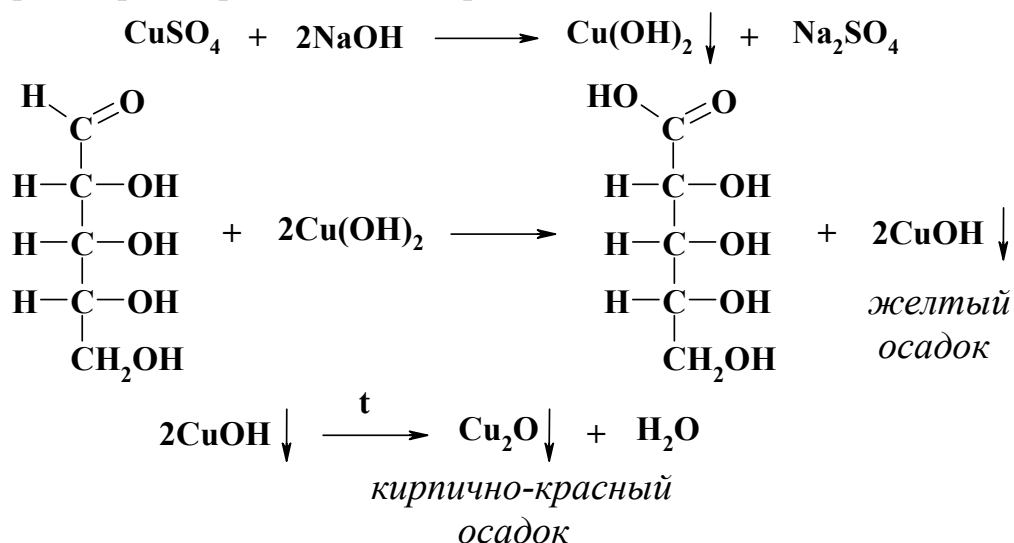
Ход определения

К 10 каплям гидролизата приливают 0,5–1 мл дифениламинового реактива. Содержимое пробирки перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 15–20 минут. Отмечают характерное окрашивание. Для приготовления дифениламинового реактива 1 г дифениланилина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и к раствору добавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты.

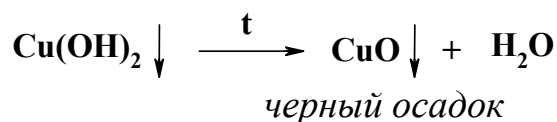
6.4.2. Проба Троммера

Эта проба, как и две последующих, основана на способности Rib и d-Rib, имеющих свободный гликозидный гидроксил, восстанавливать в щелочной среде окисные формы металлов (Cu, Fe, Bi) до закисных, а закисные – до свободного состояния. Сахара же в этих условиях дают различные продукты окисления.

Проба Троммера основана на реакциях:



Избыток CuSO_4 мешает реакции, т. к. ведет к образованию большого количества Cu(OH)_2 , который при нагревании распадается с образованием черного осадка CuO :



Ход определения

К 5 каплям гидролизата добавляют 5 капель 30 %-го раствора NaOH и несколько капель 7 %-го раствора CuSO₄ до появления исчезающей мути Cu(OH)₂. При нагревании до кипения выпадает черный осадок CuOH или красный осадок Cu₂O.

6.4.3. Проба Фелинга

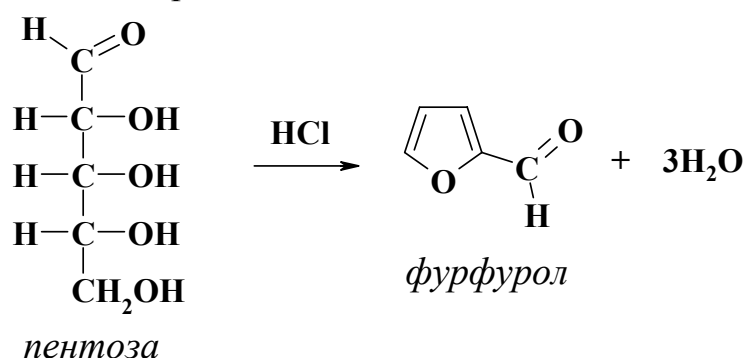
Проба Фелинга является модификацией пробой Троммера. В ней используется реактив Фелинга, для приготовления которого в пробирке смешивают 5 капель 7 %-го раствора CuSO₄ и 5 капель раствора сегнетовой соли (345 г К, Na виннокислого растворяют в дистиллированной воде, добавляют 140 г NaOH и доводят водой до 1 л).

Ход определения

К реактиву Фелинга добавляют 5–7 капель гидролизата, перемешивают и нагревают до кипения. Наблюдают выпадение окрашенного осадка.

6.4.4. Реакция Толленса

В отличие от двух предыдущих, реакция Толленса является специфичной для пентоз. Она обусловлена взаимодействием флороглюцина с фурфуролом, образующимся из пентозы при нагревании с HCl. При этом образуется продукт конденсации красного цвета.



Ход определения

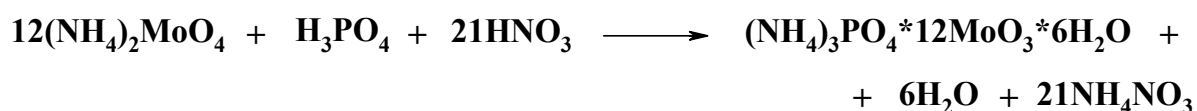
В пробирку вносят 5–7 капель гидролизата, 2–3 капли 0,5 %-го раствора флороглюцина в концентрированной HCl и кипятят в течение 1 минуты. Наблюдают за изменением окраски.

6.4.5. Реакция Молиша

В пробирку вносят 10 капель гидролизата дрожжей, добавляют 3 капли 1 %-го раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно!) приливают 20 капель концентрированной H_2SO_4 . При встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

6.5. МОЛИБДЕНОВАЯ ПРОБА НА ФОСФОРНУЮ КИСЛОТУ

В пробирку вносят 5 капель гидролизата дрожжей, добавляют 10–20 капель молибденового реактива и кипятят в течение нескольких минут. При охлаждении пробирки под струей воды выпадает кристаллический осадок фосфорной соли молибдата аммония лимонно-желтого цвета:



Приготовление молибденового реактива

В 100 мл дистиллированной воды растворяют 7,5 г молибдата аммония и добавляют 100 мл 32 %-го раствора HNO_3 плотностью 1,2 г/см³.

6.6. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НУКЛЕОТИДНОЙ ПРИРОДЫ

Метод основан на обнаружении Rib с помощью дифениламиновой реакции.

Ход определения

В пробирку наливают 5 капель аденозинтрифосфата натрия, прибавляют 10 капель дифениламинового реактива и нагревают 10 минут на кипящей водяной бане. Отмечают результат реакции.

Результаты работы оформляют в виде таблицы:

Таблица 6.1

№ опыта	Материал	Выявляемый компонент	Реакция	Результат реакции

Реакция на компоненты нуклеиновых кислот могут применяться для их идентификации и количественного анализа в биохимических исследованиях, а в фармации – для контроля качества препаратов нуклеотидной природы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА 7

ГОРМОНЫ

Гормоны – биологически активные органические вещества, вырабатываемые в эндокринных железах (щитовидной, паращитовидных, надпочечниках, поджелудочной железе, половых железах, гипофизе, эпифизе и зубной железе). Деятельность эндокринных желез находится под контролем центральной нервной системы.

По химической природе гормоны делят на гормоны полипептидной и белковой природы, гормоны – производные аминокислот и гормоны стероидной природы. К первой группе относятся гормоны паращитовидных желез, передней, задней и средней долей гипофиза, поджелудочной железы. Производными аминокислот являются гормоны мозгового слоя надпочечников, щитовидной железы, эпифиза. К третьей группе относятся гормоны коркового слоя надпочечников и половых желез.

7.1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ

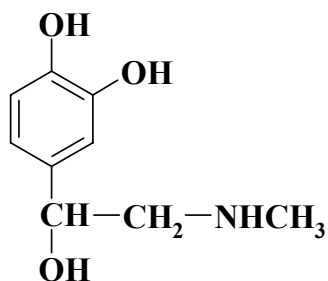
Инсулин – гормон, продуцируемый β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Инсулин регулирует уровень глюкозы в крови, он находит широкое применение при лечении сахарного диабета у людей.

Инсулин дает почти все характерные цветные реакции на белок. Для качественных реакций используют продажный инсулин в ампулах и берут по 5 капель для каждой реакции. Прodelьывают биуретовую, ксантопротеиновую и нингидриновую реакции (см. работу 1, часть 1).

7.2. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГОРМОНЫ – ПРОИЗВОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТ

7.2.1. Гормон мозгового слоя надпочечников – адреналин

По химической природе адреналин – производное пирокатехина:



адреналин

Адреналин повышает обмен веществ и оказывает выраженное влияние на углеводный обмен, его введение в организм вызывает гипергликемию и гликозурию вследствие усиленного распада гликогена. При окислении адреналина образуется адренохром.

7.2.1.1. Реакция с $FeCl_3$

Метод основан на способности пирокатехиновой группировки адреналина образовывать с $FeCl_3$ комплексное соединение изумрудно-зеленого цвета.

Ход определения

В пробирку приливают 10 капель 0,1 %-го раствора адреналина и добавляют 1 каплю 1 %-го раствора $FeCl_3$. Наблюдают за появлением характерного окрашивания. При добавлении 1 капли концентрированного раствора аммиака окраска переходит в красную, а затем в коричневую.

7.2.1.2. Диазореакция

В основе метода лежит способность адреналина образовывать с диазобензолсульфокислотой соединение красного цвета.

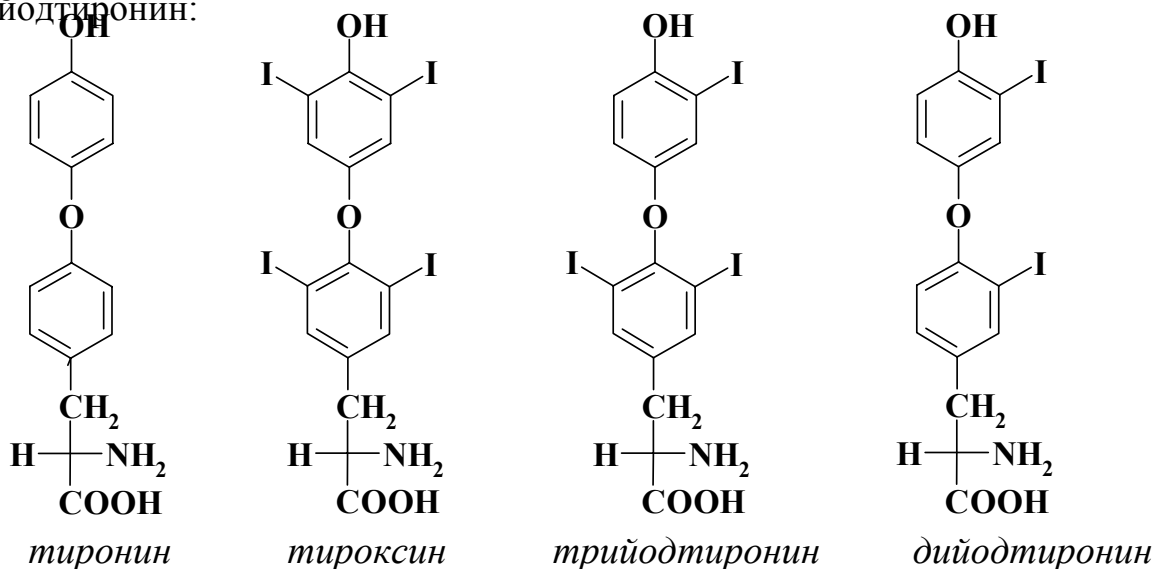
Ход определения

Для получения диазобензолсульфокислоты в пробирку помещают 3 капли 1 %-го раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5 %-го раствора нитрита натрия и перемешивают встряхиванием. Затем в пробирку добавляют 5 капель 0,1 %-го раствора адреналина и 3 капли 10 %-го раствора карбоната

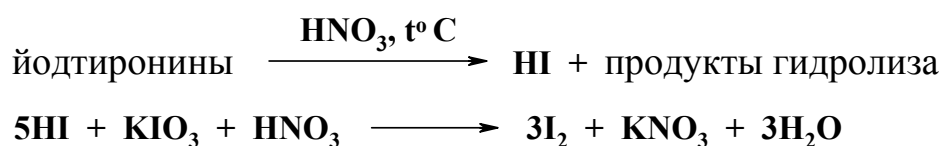
натрия. Перемешивают и наблюдают за окрашиванием жидкости в красный цвет.

7.2.2. Гормоны щитовидной железы

Основным гормоном щитовидной железы является тироксин; гормональными свойствами обладают также трийодтиронин и дийодтиронин:



Метод обнаружения йодтиронинов основан на отщеплении при кислотном гидролизе от тиреоидных гормонов (йодтиронины) йодистоводородной кислоты, при взаимодействии которой с йодатом калия выделяется свободный йод, который в хлороформе имеет фиолетовую окраску:

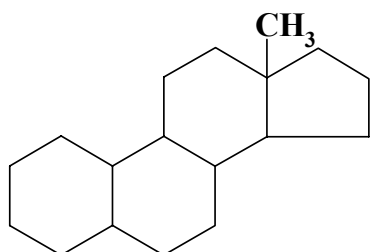


Ход определения

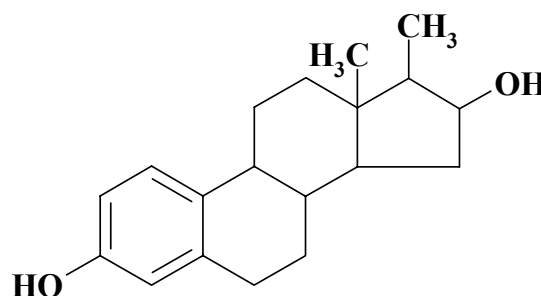
В пробирку помещают несколько кристаллов любого тиреоидина, добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты и нагревают 3–5 мин в кипящей водяной бане. Затем приливают 20 капель 1 %-го раствора KIO_3 . Содержимое перемешивают и охлаждают. После этого в пробирку добавляют 1 мл хлороформа, встряхивают и отмечают характерную окраску хлороформа.

7.3. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

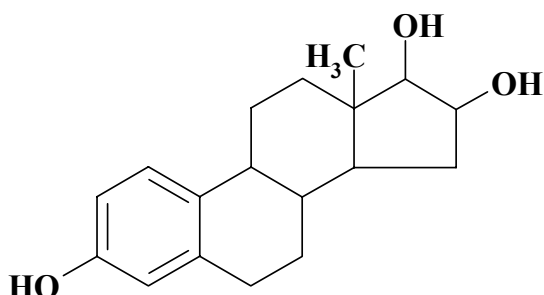
Половые гормоны играют важную роль в обмене веществ и способствуют возникновению вторичных половых признаков. Они вырабатываются половыми железами – семенниками и яичниками. К важнейшим женским половым гормонам относятся эстрадиол, эстрон (фолликулин) и эстриол:



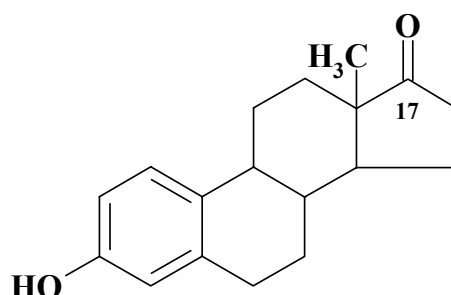
эстран



эстрадиол

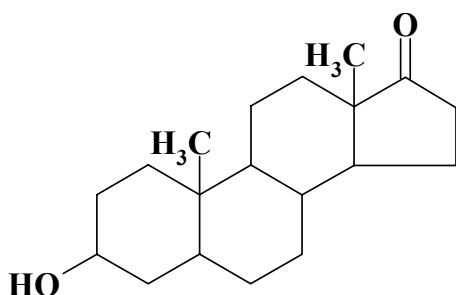


эстриол

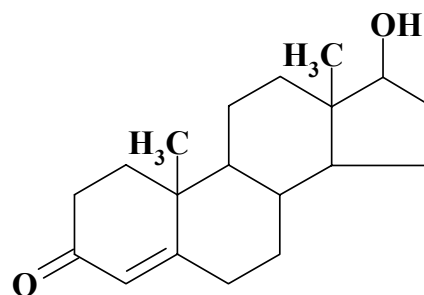


эстрон(фолликулин)

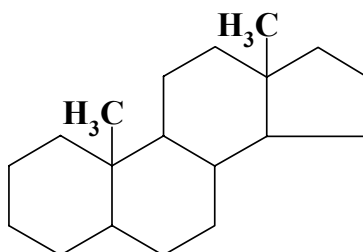
Мужские половые гормоны:



андростерон



тестостерон



андростан

7.3.1. Реакция на фенольную группу эстрогена

При взаимодействии эстрогена и серной кислоты образуется соединение соломенно-желтого цвета, которое при нагревании становится оранжевым.

Ход определения:

Для приготовления спиртового раствора фолликулина (эстрогена) содержимое 5 ампул 0,1 %-го масляного раствора фолликулина для инъекций выливают в делительную воронку, содержащую 50 мл этанола. Воронку встряхивают и после расслоения фаз нижний масляный слой отбрасывают, а для исследования используют верхний – спиртовый раствор.

В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее на 5 мин в кипящую водяную баню (для испарения спирта). Добавляют в пробирку 1 мл концентрированной серной кислоты и вновь ставят ее на 5–10 мин в кипящую водяную баню. Наблюдают за изменением окрасивания содержимого пробирки.

7.3.2. Реакция на 17-кетогруппу эстрогена и на 17-кетостероиды, содержащиеся в моче

17-Кетостероиды являются конечным продуктом обмена гормонов коры надпочечников: 17- α -окси-11-дезоксикортикостерона, кортизона, гидрокортизона и частично половых гормонов. У здоровой женщины за сутки с мочой выделяется 6–15 мг кетостероидов, у мужчин – 15–25 мг. Выделение 17-кетостероидов существенно снижается при некоторых заболеваниях гипофиза, при болезни Аддисона, при недостаточной функции семенников у мужчин. Выделение 17-кетостероидов увеличивается при опухолях семенников (до 1500 мг/сут), надпочечников (до 2000 мг/сут), а также при акромегалии. В состоянии стресса (напряжения) повышается содержание кортикостероидов в крови и увеличивается их выделение с мочой.

Экскреция гормонов и их метаболитов при физических нагрузках обычно повышается, причем при равных нагрузках у более тренированных лиц это менее выражено, чем у малотренированных. Однако при нагрузках, близких к пределу, выделение гормонов тем больше, чем выше тренированность. Снижение выделения гормонов является неблагоприятным признаком, свидетельствующим о перенапряжении и близящемся исчерпании резервных возможностей организма.

В основе метода определения 17-кетостероидов лежит их способность образовывать с *m*-динитробензолом в щелочной среде продукты конденсации вишнево-красного цвета. Интенсивность окраски пропорциональна количеству находящихся в моче 17-кетостероидов.

Ход определения

В одну пробирку вносят 5 капель спиртового раствора фолликулина, а в другую – 5 капель мочи и добавляют в них по 5 капель 30 %-го раствора NaOH и 2 %-го раствора *m*-динитробензола в этаноле. Перемешивают содержимое встряхиванием и наблюдают за развитием характерного окрашивания.

Практическое значение работы

Специфические реакции на гормоны используются для их количественного определения и при анализе гормональных препаратов в контрольно-аналитических лабораториях.

Определение продуктов обмена стероидных гормонов 17-кетостероидов используется в клинике для оценки функционального состояния коры надпочечников и половых желез.

Исследования выделения с мочой адреналина и норадреналина, а также стероидных гормонов коры надпочечников используются при определении уровня специальной тренированности спортсмена.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. М.В.Ермолаев, Л.П.Ильичева.– Биологическая химия, М.: Медицина, 1989. – 320 с.
2. Л.М.Пустовалова. – Практикум по биохимии, Ростов н/Д: Феникс, 1999. – 544 с.
3. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / под ред. Т.Т.Березова. – М.: Медицина, 1976. – 296 с.
4. Е.А.Строев, В.Г.Макарова, Практикум по биологической химии., М.: Высш. шк., 1986. – 232 с.

Учебное электронное текстовое издание

Токарева Мария Игоревна
Селезнева Ирина Станиславовна

БИОХИМИЯ В 3 ЧАСТЯХ. ЧАСТЬ 2

Редактор *Л.Д. Селедкова*
Компьютерная верстка *А.А. Шолина*

Рекомендовано РИС ГОУ ВПО УГТУ-УПИ
Разрешен к публикации 10.11.05.
Электронный формат – PDF
Формат 60x90 1/8

Издательство ГОУ-ВПО УГТУ-УПИ
620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19
e-mail: sh@uchdep.ustu.ru

Информационный портал
ГОУ ВПО УГТУ-УПИ
<http://www.ustu.ru>